Резюме: В статье представлены материалы исследований по применению янтарного биостимулятора для снижения реактогенности вакцины против некробактериоза в системе мер профилактики и борьбы с некробактериозом коров в условиях современных молочных комплексов.

SUMMARY
In the article materials of reaserches are presented on application of amber biostimulyatora for the decline of reaktogennosti of vaccine in the system of measures of prophylaxis of nekrobakterioza of cows in the conditions of modern sucklings farm.

Keywords: necrobacteriosis, vaccinal prevention, cows, an amber biostimulator, a vaccine from a necrobacteriosis

Литература

1. Глотов А.Г., Нефедченко А.В., Глотова Т.И., Кручинкин М.Н.. Влияние вакцинации и иммуномодуляторов на течение ИРТ КРС у быков-производителей. Ветеринария.-,2003.-№2.-С. 17-20.
2. Лебедев А.Ф. Разработка и применение препаратов на основе янтарной кислоты / А.Ф.Лебедев, О.М.Швец, А.А.Евглевский, Е.П.Евглевская и др. // Ветеринария. 2009.-№ 3.- С. 48-51.
3. Мищенко В. А. Особенности иммунодефицитов у крупного рогатого скота / В. А. Мищенко, Н. А. Яременко, А. В. Мищенко, А. В. Кононов, В. В. Думова // Ветеринария. – 2006. - № 11. – с. 17-20.

Контактная информации об авторах для переписки
А.А. Евглевский, ГНУ Курский НИИ агропромышленного производства Россельхозакадемии, заведующий лабораторией «Ветеринарная медицина», доктор ветеринарных наук, профессор; 305014, г. Курск, ул. Шпайерская, д. 21, 1, Российская Федерация (RU), тел. 58-23-93;
А.Ф. Лебедев, Управление ветеринарии Курской области, начальник, кандидат ветеринарных наук; 305000, г. Курск, ул. Радищева, 17/19;
В.Ю. Тарасов, ГУ «Курская областная станция по борьбе с болезнями животных», начальник, соискатель; 305023, г. Курск, ул. 2-Шоссейный переулок, д.15, корпус б.
Адрес для переписки: ГУ «Курская областная станция по борьбе с болезнями животных», 305023, г. Курск, ул. 2-ой Шоссейный переулок, д. 15-б, E-mail: vetobl @ kursknet. ru

УДК 619:616.98:578.829.91:616-078
Константинова Е.А., Блотова Г.А., Старов С.К., Константинов А.В., Диев В.И.
(ОБТК ФГУ «ВНИИЗЖ»)

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЭФЕМЕРНОЙ ЛИХОРАДКИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ключевые слова: эфемерная лихорадка крупного рогатого скота, крупный рогатый скот, кролик, специфическая сыворотка крови, адъюванты, реакция длительного связывания комплемента

Введение

Эфемерная лихорадка (ЭЛ) (трёхдневная лихорадка, болезнь неподвижности, эпизоотическая лихорадка, bovine ephemeral fever) – острая, протекающая в виде эпизоотий и энзоотий вирусная болезнь крупного рогатого скота (КРС), проявляющаяся кратковременной лихорадкой, воспалением слизистых оболочек носовой и ротовой полостей, пищевода, глаз, ригидностью мышц, тугоподвижностью, хромотой.

Возбудитель относится к сем. Rhabdoviridae роду Ephemerovirus, распространяется различными видами кровососущих насекомых из рода Culicoides, а также рода Culex и Anopheles. Эфемерную лихорадку регистрировали во многих странах, в том числе в сопредельных с Россией государствах, таких как Китай, Монголия, Япо-

ния [1, 2, 4, 5]. Считается, что Россия благополучна по ЭЛ, однако, трансмиссивный характер болезни является одним из факторов возможности заноса на ее территорию возбудителя вируса ЭЛ КРС (ВЭЛ КРС). Поэтому своевременная диагностика болезни, разработка методов обнаружения вируса или антител к ЭЛ являются актуальной проблемой.

По данным M.F. Uren [5], диагностика болезни проводится по сыворотке крови переболевшего крупного рогатого скота через две-три недели после начала клинических признаков болезни. С этой целью ставится реакция нейтрализации с определением титра антител. В качестве других реакций используются реакция связывания комплемента (РСК) и метод иммуноферментного анализа (ИФА).

В качестве одного из компонентов при серологической диагностике инфекционных заболеваний используется гипериммунная сыворотка крови животных.

С целью усовершенствования метода получения гипериммунной сыворотки с более высокой специфической активностью мы провели исследования по гипериммунизации крупного рогатого скота и кроликов с использованием различных адъювантов.

Материалы и методы

Для иммунизации животных использовали очищенный и концентрированный антиген ВЭЛ КРС. Для его получения использовали вирусную суспензию, полученную в результате культивирования производственного штамма «ВНИИЗЖ-М» вируса эфемерной лихорадки крупного рогатого скота на 3-х суточной культуре клеток ВНК-21 в клинских матрасах. При появлении ЦПД на 70-90% площади монослоя, сливали ростовую среду и стерильным резиновым шпателем отделяли инфицированный слой клеток от стекла, ресуспендируя их в объеме 1,0 см^3 физиологического раствора. Инфекционная активность полученного вирусного концентрата составила в культуре клеток Vero 8,5 lg ТЦД$_{50/СМ}{}^3$, а титр в РДСК соответствовал 1:320, в то время как исходная вирусная суспензия имела инфекционную активность 6,5 lg ТЦД$_{50/СМ}{}^3$, а титр в РДСК – 1:16.

Первоначально вирусный материал очищали центрифугированием с 20%-ным раствором сахарозы в течение 1,5 ч при 20000 g. Полученный осадок растворяли в физиологическом растворе до первоначального объема и центрифугировали в градиенте плотности 5%, 10%, 15%, 20% и 25% раствора сахарозы при 20000 g в течение 2 ч. Образовавшийся осадок ресуспендировали в физиологическом растворе в объеме 1/10 от первоначального объема и использовали в дальнейшем в качестве антигена.

Для получения специфической сыворотки крови провели гипериммунизацию трех голов крупного рогатого скота. Иммунизировали животных четырехкратно. После первого введения антигена иммунизацию проводили на 21, 28 и 35 дни с интервалом в 7 дней между инъекциями. Первому животному вводили по 1 см^3 антигена с содержанием 0,25 мг сапонина подкожно, второму – 2 см^3 антигена с адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1 внутримышечно (при первой иммунизации использовали полный адъювант, а при последующих – неполный), третьему – 1 см^3 антигена подкожно в область шеи. Перед каждой иммунизацией, а также на 42 день были получены сыворотки крови животных, которые были исследованы в РДСК на наличие антител.

Для получения специфической сыворотки ВЭЛ КРС на кроликах использовали клинически здоровых животных средней упитанности, массой 2,5-3,0 кг.

Первой группе кроликов при первой иммунизации антиген вводили в объеме 1,0 см^3 в подушечки задних лап, при второй – 2,0 см^3 в область подколенных лимфоузлов, при третьей – внутримышечно в бедро задней ноги 0,5 см^3 антигена и 0,5 см^3 полного адъюванта Фрейнда и при четвертой - 0,5 см^3 антигена и 0,5 см^3 неполного адъюванта Фрейнда подкожно в область спины в несколько точек.

Второй группе кроликов аналогично при первой иммунизации вводили 0,5 см^3 антигена и 0,5 см^3 полного адъюванта Фрейнда, при второй - 1,0 см^3 антигена и 1,0 см^3 неполного адъюванта Фрейнда, при третьей и четвертой - 0,5 см^3 антигена и 0,5 см^3 неполного адъюванта Фрейнда.

Третьей группе животных при первой и второй инъекциях вводили антиген по 1,0 и 2,0 см^3, при третьей и четвертой - 0,5 см^3 антигена и 0,5 см^3 монтанида 70.

В четвертой группе кроликов при первой, второй, третьей и четвертой инъекциях использовали антиген и монтанид 70 в соотношениях 0,5 см^3+0,5 см^3; 1,0 см^3 +1,0 см^3; 0,5 см^3 +0,5 см^3 и 0,5 см^3 +0,5 см^3 соответственно.

Результаты исследований

Было установлено, что специфическая активность сыворотки крови КРС зависе-

ла от адъюванта, используемого при проведении гипериммунизации (таблица 1). Наибольшая активность сыворотки крови выявлена при иммунизации животных антигеном с адъювантом Фрейнда, титр которой достигал величины 1:80, тогда как после иммунизации антигеном с сапонином он был в пределах 1:60, а только антигеном – 1:30.

Таблица 1

Зависимость специфической активности сывороток крови крупного рогатого скота в РДСК от схемы иммунизации антигеном ВЭЛ

№№ животных	Метод иммунизации	Титры антител после иммунизации			
		1-ой	2-ой	3-ей	4-ой
1	1,0 см^3 антигена + 0,25 мг сапонина подкожно	1:30	1:30	1:40	1:60
2	1,0 см^3 антигена + 1,0 см^3 адъюванта Фрейнда* внутримышечно	1:30	1:40	1:80	1:80
3	1,0 см^3 антигена подкожно	1:10	1:30	1:30	1:30

* - при первой иммунизации использовали полный адъювант Фрейнда, а при следующих – неполный.

Таблица 2

Специфическая активность сыворотки крови после гипериммунизации кроликов ВЭЛ КРС

№№ группы животных	Метод иммунизации				Титр антител в РДСК
	в подушечки задних лап	в область подколенных лимфоузлов	в бедро задней лапы внутримышечно	в область спины подкожно	
1	1,0 см^3 Аг*	2,0 см^3 Аг*	0,5 см^3 Аг* + 0,5 см^3 полного адъюванта Фрейнда	0,5 см^3 Аг* + 0,5 см^3 неполного адъюванта Фрейнда	1:160
2	0,5 см^3 Аг* + 0,5 см^3 полного адъюванта Фрейнда	1,0 см^3 Аг* + 1,0 см^3 неполного адъюванта Фрейнда	0,5 см^3 Аг* + 0,5 см^3 неполного адъюванта Фрейнда	0,5 см^3 Аг* + 0,5 см^3 неполного адъюванта Фрейнда	1:80
3	1,0 см^3 Аг*	2,0 см^3 Аг*	0,5 см^3 Аг* + 0,5 см^3 монтанида 70	0,5 см^3 Аг* + 0,5 см^3 монтанида 70	1:40
4	0,5 см^3 Аг* + 0,5 см^3 монтанида 70	1,0 см^3 Аг* + 1,0 см^3 монтанида 70	0,5 см^3 Аг* + 0,5 см^3 монтанида 70	0,5 см^3 Аг* + 0,5 см^3 монтанида 70	1:40

* Аг - специфический антиген ВЭЛ КРС.

Более выражено накопление антител после применения адъювантов. Так при введении животным только антигена после первой инъекции титр антител был 1:10, после второй, третьей и четвертой – 1:30, а после первой и второй инъекции антигена с сапонином – 1:30, после третьей – 1:40 и четвертой – 1:60, а антигена с адъювантом Фрейнда – 1:30, 1:40, 1:80 и 1:80 соответственно.

В результате гипериммунизации кроликов получены сыворотки крови с высокой специфической активностью, которая зависела от адъюванта (таблица 2). Так специфическая активность сыворотки крови кроликов при иммунизации антигеном в сочетании с монтанидом не превышала 1:40, а при использовании адъюванта Фрейнда с первой иммунизации – 1:80.

Наибольшая активность сыворотки выявлена у животных первой группы, где использовали адъювант Фрейнда, начиная с третьей иммунизации. В этом случае титр антител достигал величины 1:160.

Полученные гипериммунные сыворотки крови КРС и кроликов были использованы для определения в РДСК специфической активности культурального производственного штамма «ВНИИЗЖ-М» и для ретроспективной диагностики – определения уровня антител в крови животных, переболевших эфемерной лихорадкой. Титр вируса был в пределах 1:16, а антител в крови переболевших животных в пределах 1:5-1:40.

Заключение

При гипериммунизации крупного рогатого скота и кроликов концентрированным и очищенным антигеном вируса эфемерной лихорадки крупного рогатого скота с адъювантом Фрейнда возможно получение специфической сыворотки крови с высокой активностью – 1:80 и 1:160 соответственно, которая может быть использована в РДСК для определения активности антигена ЭЛ и ретроспективной диагностики заболевания КРС.

Резюме: Используя специфический антиген и адъюванты, были получены сыворотки крови крупного рогатого скота и кроликов с высокой специфической активностью к вирусу эфемерной лихорадки, которые в дальнейшем могут быть использованы в серологических реакциях для определения специфической активности культурального вируса и ретроспективной диагностики болезни.

Ключевые слова: эфемерная лихорадка крупного рогатого скота, крупный рогатый скот, кролик, специфическая сыворотка крови, адъюванты, реакция длительного связывания комплемента

SUMMARY

Bovine and rabbit sera with high specific activity against ephemeral fever virus were prepared using specific antigen and adjuvants; these sera can be used in future in serological tests for determination of cultural virus specific activity and retrospective diagnosis of the disease.

Keywords: bovine ephemeral fever, cattle, rabbit, specific sera, adjuvants, prolonged complement fixation test

Литература

. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.Ф. Фомина. – М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.

2. Курченко Ф.П. Эфемерная лихорадка крупного рогатого скота (обзор иностранной литературы) // Ветеринария. – 1985. - №6. – С. 67-69.

3. Экспериментальные исследования по изучению клиники эфемерной лихорадки крупного рогатого скота и получению диагностических препаратов / В.И. Диев, А.С. Назаров, В.М. Захаров [и др.] // Вирусные и микробные болезни животных: сб. науч. тр. – Владимир, 1995. – С. 128-131.

4. Nandi S., Negi B.S. Bovine ephemeral fever: a review // Comparative Immunologi, Microbiologi & Infectious Diseases. – 1999. – Vol. 22. – P. 81-91.

5. Uren M.F. Bovine ephemeral fever // Austral. Vet. J. – 1989. – W. 66, N. 8 – P. 233-236.

Контактная информации об авторах для переписки

Константинова Е.А., ведущий биолог ОБТК ФГУ «ВНИИЗЖ», аспирантка 3 года обучения, konstantinov@arriah.ru, или katochek78@mail.ru, +7-919-013-20-88.